

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-140698

(43)Date of publication of application : 04.06.1996

(51)Int.Cl.

C12Q 1/06

// C12M 1/34

(21)Application number : 06-312365

(71)Applicant : IDEMITSU KOSAN CO LTD

(22)Date of filing : 24.11.1994

(72)Inventor : SATO MIKIO

ITO ASAMI

(54) RAPIDL MEASURMENT OF NUMBER OF BACTERIUM

(57)Abstract:

PURPOSE: To rapidly and simply measure number of bacteria in a smale from degree of pigmentation without requiring special equipment by charging a bacterial sample into a filtering container to which a hydrophobic filter is attached, adding a pigment solution and a cleaning solution thereto and filtering the mixture.

CONSTITUTION: This method for measuring number of bacteria in a sample comprises charging a bacterial sample into a filtering container to which a hydrophobic filter is attached, successively adding a pigment solution having 0.001-0.5% (W/V) concentration and a cleaning solution of 5-200 volume based on 1 volume of the pigment solution to the bacterial sample or adding the cleaning solution containing the pigment solution thereto and then filtering the sample. Thereby, collection of dyed bacteria on the hydrophobic filter and removal of excess pigment are simultaneously carried out and degree of pigmentation of the hydrophobic filter is measured by eluting the pigment with which bacterium is colored by using an organic solvent and subjecting a pigmentation degree of the eluted solution to colorimetric determination by optical densily measurement. Thus, the number of bacteria in the sample is rapidly and simply measured by the filtration operation at one stage without requiring special equipment or professional knowledge.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-140698

(43) 公開日 平成8年(1996)6月4日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/06		6807-4B		
// C 1 2 M 1/34	D			

審査請求 未請求 請求項の数6 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平6-312365

(22) 出願日 平成6年(1994)11月24日

(71) 出願人 000183646

出光興産株式会社

東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

(72) 発明者 佐藤 幹夫

千葉県袖ヶ浦市上泉1280番地 出光興産株式会社内

(72) 発明者 伊藤 朝美

千葉県袖ヶ浦市上泉1280番地 出光興産株式会社内

(74) 代理人 弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

(54) 【発明の名称】 細菌数の迅速測定方法

(57) 【要約】

【目的】 特別な設備や専門的な知識を必要とせず、しかも1段階の濾過操作で迅速(1分以内に)かつ簡便に、試料中の細菌数を測定する方法を提供することを目的とする。

【構成】 試料中の細菌数を測定する方法において、①疎水性フィルターを装着した濾過容器に細菌試料を入れ、次いでこの細菌試料に色素液、洗浄液を順次添加するか、或いは色素を含有する洗浄液を添加した後、濾過することにより、又は②洗浄液と色素液を入れるか、或いは予め色素を含有する洗浄液の入った疎水性フィルターを装着した濾過容器に、細菌試料を入れ、濾過することにより、疎水性フィルターへの染色された細菌の捕集と過剰色素の除去とを同時に行ない、疎水性フィルターの着色度から試料中の細菌数を測定することを特徴とする細菌数の迅速測定方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中の細菌数を測定する方法において、疎水性フィルターを装着した濾過容器に細菌試料を入れ、次いでこの細菌試料に色素液、洗浄液を順次添加するか、或いは色素を含有する洗浄液を添加した後、濾過することにより、疎水性フィルターへの染色された細菌の捕集と過剰色素の除去とを同時に行ない、疎水性フィルターの着色度から試料中の細菌数を測定することを特徴とする細菌数の迅速測定方法。

【請求項 2】 試料中の細菌数を測定する方法において、洗浄液と色素液を入れるか、或いは予め色素を含有する洗浄液の入った疎水性フィルターを装着した濾過容器に、細菌試料を入れ、濾過することにより、疎水性フィルターへの染色された細菌の捕集と過剰色素の除去とを同時に行ない、疎水性フィルターの着色度から試料中の細菌数を測定することを特徴とする細菌数の迅速測定方法。

【請求項 3】 細菌に着色した色素を有機溶剤で溶出し、溶出液の着色度を光学密度測定により比色定量する請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】 試料が尿である請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 5】 色素液に対して、洗浄液を 5 ～ 2 0 0 容量倍使用する請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 6】 色素液の濃度が、0.0001 ～ 0.5 % (w/v) である請求項 1 又は 2 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、高度な技術や専門的な知識を必要とすることなく、1 段階の濾過操作で試料中の細菌数を迅速、かつ、簡便に測定する方法に関する。本発明は、尿中の細菌が問題となる診断分野をはじめ、金属加工油分野、腐敗が問題となる染料分野、食品分野、温泉水などの環境分野など、広汎な分野において有効に利用することができる。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】従来より、尿検査分野などでは、炎症の発見や病状を推定するために、尿等の試料中の細菌数等の測定が行なわれている。例えば、尿中の細菌が増殖した場合、細菌尿症と診断され、尿路感染症が暗示される。従って、早期治療や薬投与のため、細菌数の測定を行なっている。また、食品分野などでは、食品が腐敗していないかどうかを判断するために、食品中の細菌数等の測定が行なわれている。

【0003】このような場合の細菌数の測定は、寒天平板培養法により行なわれるのが主流である。しかしながら、この培養法では、専門技術と恒温槽という機器が必要であり、また結果が出るのに 2 4 ～ 4 8 時間を要する。例えば、尿検査では、外来患者の尿試料は細菌検査

室か、または検査センターで培養検査が行なわれるため、結果が医者に分かるのは数日後である。精度の高い診断を行なうために、迅速な細菌測定法が求められている。一方、食品の場合、大腸菌検査と一般細菌検査とがあり、大腸菌検査は 1 8 時間培養で結果が出るものの、一般細菌検査では 2 4 時間以上の培養が必要であり、多くの食品の場合、製品出荷後に結果が出るのが通常である。また、水溶性切削油などの金属加工油分野では、細菌が増殖して油剤が腐敗することがある。現在、簡易培養キット（例：商品名＝イージーカルト）で細菌の有無がチェックされているが、結果が出るのに 4 8 時間を要する。従って、腐敗防止対策が後手に回り、腐敗による悪臭の発生を防止できない場合がある。さらに、現在実用化されていないが、細菌の酵素活性を測定する方法（特開昭 5 7 - 7 4 0 9 5 号公報）、蛍光色素法（特開昭 6 2 - 1 3 8 1 8 5 号公報）、フィルター染色法（特開平 1 - 1 2 4 7 6 7 号公報）等が提案されているが、酵素活性測定用試薬の不安定性、特殊機器（蛍光光度計）の必要性、染色法の操作性の煩雑さ等の欠点があった。

【0004】本出願人は、このような従来の欠点を解消するものとして、試料中の微生物生菌数を測定するにあたり、微生物を染色した後に疎水性フィルターに捕集するか、或いは疎水性フィルターに捕集した後に微生物を染色し、次いで過剰の色素を洗浄により除去し、微生物の着色度から試料中の微生物菌数を測定する方法を既に提案している（特開平 4 - 2 1 8 3 9 2 号公報）。この方法によれば、熟練した技術や専門的な知識、特別な設備などを必要とせず、しかも迅速、かつ、簡便に試料中の微生物菌数を測定することが可能となった。しかし、2 段階の濾過操作が必要であるため、実際使用してみると、操作が煩雑であるという問題があった。

【0005】本発明者らは、このような従来の欠点を解消し、試料中の細菌数をより迅速簡便に測定し得る方法を開発すべく鋭意研究を重ねた結果、①疎水性フィルターを装着した濾過容器に細菌試料を入れ、次いでこの細菌試料に色素液、洗浄液を順次添加するか、或いは色素を含有する洗浄液を添加した後、濾過することにより、又は②色素液と洗浄液を入れるか、或いは予め色素を含有する洗浄液の入った疎水性フィルター装着の濾過容器に、最後に細菌試料を入れて濾過することにより、1 段階の濾過操作にて、染色された細菌の疎水性フィルターへの捕集と過剰色素の除去とを同時に行なうことができ、しかもこのようにして得られる疎水性フィルターの着色度から試料中の細菌数を十分な精度で測定し得ることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち本発明は、特別な設備や専門的な知識を必要とせず、しかも 1 回の濾過操作で迅速（1 分以内に）、かつ簡便に、試料中の細菌数を測定する方法



を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は第1に、試料中の細菌数を測定する方法において、疎水性フィルターを装着した濾過容器に細菌試料を入れ、次いでこの細菌試料に色素液、洗浄液を順次添加するか、或いは色素を含有する洗浄液を添加した後、濾過することにより、疎水性フィルターへの染色された細菌の捕集と過剰色素の除去とを同時に行ない、疎水性フィルターの着色度から試料中の細菌数を測定することを特徴とする細菌数の迅速測定方法を提供するものである。

【0008】さらに、本発明は第2に、試料中の細菌数を測定する方法において、洗浄液と色素液を入れるか、或いは予め色素を含有する洗浄液の入った疎水性フィルターを装着した濾過容器に、細菌試料を入れ、濾過することにより、疎水性フィルターへの染色された細菌の捕集と過剰色素の除去とを同時に行ない、疎水性フィルターの着色度から試料中の細菌数を測定することを特徴とする細菌数の迅速測定方法を提供するものである。

【0009】本発明を適用することができる試料は、特に制限はなく、例えば尿を初めとして、切削油、圧延油、熱処理油などの水溶性金属加工油、液体調味料（醤油、ソースなど）、液体飲食品（例えば発酵乳・乳酸菌飲料など）、酒類（例えばワイン、清酒など）などの液状食品、粉末や固形食品（例えば野菜、魚肉など）の場合には洗浄した試料、水溶性塗料等、さらには河川水、池水、温泉水、水槽水、生活廃水などの水等にも幅広く適用することができる。なお、試料は必要に応じて、適宜、希釈したり、或いは例えば固形食品などの場合には破碎した後に、希釈したりするなどして測定用試料とする。本発明は、このような試料中に存在する細菌、例えば大腸菌（*Escherichia Coli*）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）などについて、その総数を迅速に測定しようとするものである。

【0010】本発明では、疎水性フィルターを装着した濾過容器に細菌試料を入れ、次いでこの細菌試料に色素液、洗浄液を順次添加するか、或いは色素を含有する洗浄液を添加した後、濾過することにより（本発明の第1）、又は洗浄液と色素液を入れるか、或いは予め色素を含有する洗浄液の入った疎水性フィルターを装着した濾過容器に、細菌試料を入れ、濾過することにより（本発明の第2）、疎水性フィルターへの染色された細菌の捕集と過剰色素の除去を同時に（1回の濾過操作で）行なう。

【0011】本発明では、まず疎水性フィルターを装着した容器に細菌試料を入れ、次いで、この細菌試料に色素液、洗浄液を順次添加するか、或いは色素を含有する洗浄液を添加する（本発明の第1）。すなわち、細菌試料を、例えば動物細胞除去用のフィルターを装着したス

ポイトなどを用いて採取して動物細胞を除き、採取した細菌試料を、疎水性フィルターを装着した濾過容器、例えば加圧濾過しうる注射器や吸引濾過しうる吸引濾過具などに入れる。

【0012】細菌捕集用のフィルターとして、本発明の方法では疎水性フィルターを用いる。疎水性フィルターは極性が弱い、或いは極性がなく、過剰の色素の除去が容易であるため細菌捕集用のフィルターとして好適である。一方、極性のあるフィルターは過剰の色素の除去が容易ではないため、好ましくない。このような疎水性フィルターとしては、例えばナイロン系、ポリテトラフルオロエチレン（四フッ化エチレン樹脂）等のフッ素系、ポリプロピレンなどのポリオレフィン系、ポリカーボネート系、或いはガラス系などの疎水性フィルターが挙げられる。これらのフィルターの中でも特にポリテトラフルオロエチレンやポリプロピレンを材料とする疎水性フィルターが、過剰の色素の除去が容易であるため好ましい。また、親水性の材料、例えばニトロセルロース系フィルターを表面処理により疎水性にすれば、疎水性フィルターとして使用することができる。ここで表面処理としてはコーティングなどであり、コーティングに用いる材料として、前記ナイロン系、フッ素系、ポリオレフィン系の材料などを用いることができる。

【0013】この細菌捕集用の疎水性フィルターの濾過孔径は、細菌の捕集に通常使用される0.2～3.0μm程度の範囲で良い。なお、試料中に細菌より大型の動物細胞、例えば白血球などが共存する場合には、細菌は通過するが、そのような大型の動物細胞を通過させず、捕集することができるプレフィルター（例えば、濾過孔径が6～8μm程度のもの）を用いて前処理すればよい。このようなプレフィルターとしては、ポリプロピレン系のフィルター（濾過孔径が7μm程度のもの）、後記する実施例の「ゴナビスライド・新ゴナビスライド」（持田製薬製）などの妊娠診断薬用尿採取フィルター（材質：塩ビ系）、市販の油性ペンなどで使用されているフェルト、不織布などを使用することができる。また、上記2枚のフィルター（細菌捕集用の疎水性フィルターとプレフィルター）を重ねて使用することにより、前処理操作を省略し、最後の判定の段階で、プレフィルターを取り外して測定してもよく、或いは濾過前に取り外しておいてもよい。特に細菌以外の動物細胞が多量に存在する場合には後者の方が好ましい。なお、プレフィルターによる前処理は、吸引濾過、或いは加圧濾過のいずれによっても行なうことができる。

【0014】この細菌捕集用の疎水性フィルターの吸引又は加圧濾過面積（着色域の面積）の大きさは、見やすければ特に制限はない。吸引又は加圧濾過される部分の形は特に問わないが、見やすさの点で円形が望ましく、その口径（直径）が2～6mm程度の円形のものが好ましい。この細菌捕集用の疎水性フィルター全体の大きさは

10

20

30

40

50

特に制限はない。また、この疎水性フィルター全体の形状は見やすさの点で円形が好ましく、その口径（直径）は7～15mm程度のものが好ましい。

【0015】この細菌捕集用の疎水性フィルターの色としては、用いる色素を考慮して、判定容易な色を定めればよい。着色の程度を容易に判定するためには、白色の疎水性フィルターが好ましい。また、透明、半透明の疎水性フィルターも用いることができ、白色用紙の上に疎水性フィルターを載せて判定すると、判定が容易となる。

【0016】上記の如き疎水性フィルターを装着した濾過容器（例えば加圧濾過しうる注射器や吸引濾過しうる吸引濾過具など）に細菌試料を入れ、次いでこの細菌試料に色素液、洗浄液を順次添加するか、或いは色素を含有する洗浄液を添加する。なお、色素液の添加と洗浄液の添加は、いずれを先に行なっても良い。また、場合によっては、本発明の第2に示すように、色素液や洗浄液、或いは色素を含有する洗浄液を先に添加し、次いで細菌試料を入れてもよいし、さらには、色素液と洗浄液と細菌試料とを、或いは色素を含有する洗浄液と細菌試料とを、同時にに入れてもよい。要するに、これらが、濾過前に濾過容器内に存在していればよい。

【0017】ここで色素液としては、細菌の染色に使用可能な色素を、水又は各種緩衝液を用いて色素液としたものが用いられる。細菌の染色に使用可能な色素としては、例えばサフラニン、フクシン、メチレンブルー、メチルグリーン、クリスタルバイオレット、ゲンチアナバイオレット、ピクトリアブルーBなどが挙げられ、特に判定のし易さの点より、サフラニン、フクシン、メチレンブルー、メチルグリーンが好ましい。

【0018】上記のように、色素液とするには、水又は緩衝液が使用可能である。緩衝液の使用可能pHは4～9であり、色素の安定性の点から好ましくはpH5～7である。必要に応じて、エタノールなどの防腐剤や界面活性剤等を添加することもできる。使用可能な色素濃度は、フクシンの場合、通常、0.0001～0.5%（w/v）、好ましくは0.0005～0.05%（w/v）、さらに好ましくは0.001～0.02%（w/v）である。ここで色素の濃度が、0.0001%未満であると着色が不充分となり、一方、色素液の濃度が0.5%を超えると過剰の色素の除去が困難となるため、いずれも好ましくない。

【0019】なお、必要に応じて、上記の色素液に防腐剤としてエタノールを添加する場合には0.1～10%（v/v）添加すればよく、また、界面活性剤を添加する場合には、界面活性剤を0.001～1.0%（w/v）の割合で添加すればよい。なお、検体（試料）の量は、通常、50～150μlであり、このような1試料（50～150μl）当たりの色素液の使用量は少なくとも20μl必要であるが、100μl以上は必要ない。色素液が多いと洗浄液も多くなり、無駄となる。

【0020】次に、洗浄液としては、水又は緩衝液を使用することができる。緩衝液の使用可能pHは4～9であり、色素の安定性の点から好ましくはpH5～7である。必要に応じて、エタノールなどの防腐剤や界面活性剤等を添加することができる。その場合には、エタノールは0.1～10%（v/v）添加すればよく、また、界面活性剤を添加する場合には、界面活性剤を0.001～1.0%（w/v）の割合で添加すればよい。洗浄液の使用量は、色素液の量と関係し、色素液に対して洗浄液を5～200容量倍、好ましくは10～50容量倍使用する。洗浄液の使用量が色素液に対して5容量倍未満であると、洗浄が不完全となり、一方、洗浄液の使用量が色素液に対して200容量倍を超えたものであると、着色度が弱く、測定することが不可能となる。なお、洗浄液の使用量は、色の対照表や検量線を作成する際の使用量と、細菌数未知試料を洗浄する使用量とを等量にすることが、誤差を抑える意味で好ましい。

【0021】また、前記した如き洗浄液に、前もって色素を添加して色素含有洗浄液として使用する場合には、洗浄液に上記した如き色素液を上記の容量比で添加しても良く、或いは洗浄液に相当分の色素のみを添加してもよい。

【0022】以上のように、疎水性フィルターを装着した濾過容器に細菌試料を入れ、次いでこの細菌試料に色素液、洗浄液を順次添加するか、或いは色素を含有する洗浄液を添加した後、濾過する。又は本発明の第2のように、色素液と洗浄液を添加するか、或いは予め色素を含有する洗浄液を添加した疎水性フィルター装着の濾過容器に、最後に細菌試料を添加して濾過しても良い。濾過方法としては、注射器などによる加圧濾過であっても良いし、或いは吸引濾過具などによる吸引濾過であっても良い。本発明の方法によれば、このように①疎水性フィルターを装着した濾過容器に細菌試料を入れ、次いでこの細菌試料に色素液、洗浄液を順次添加するか、或いは色素を含有する洗浄液を添加した後、濾過することにより、又は順序を変え、②色素液と洗浄液を添加するか、或いは予め色素を含有する洗浄液の入った疎水性フィルター装着の濾過容器に、最後に細菌試料を添加して濾過することにより、染色された細菌の疎水性フィルターへの捕集と過剰色素の除去とを同時に行なうことができ、操作工程が簡便となる。

【0023】なお、吸引濾過による場合、通常は、細菌捕集用の疎水性フィルターを所定の吸引濾過具に装着し、この吸引濾過具に細菌試料を入れ、次いでこの細菌試料に色素液、洗浄液を順次添加するか、或いは色素を含有する洗浄液を添加した後、吸引濾過することにより、疎水性フィルターへの染色された細菌の捕集と過剰色素の除去とを同時に行なう。ここで吸引濾過具は、通常は、細菌捕集用の疎水性フィルターを装着して主に濾過を受け持つ濾過具と、主に吸引を受け持つ吸引具とか



らなるものであり、例えば細菌捕集用の疎水性フィルターを装着しうるロート型濾過器などと、吸引ポンプとを組合せたものを用いることができる。また、注射器で吸引しても良い。より具体的には例えば、上記したようなロート型濾過器などの濾過具に、細菌捕集用の疎水性フィルターを装着し、この濾過具の下部に、吸引ポンプなどの吸引具を配置し、試料を吸引濾過すればよい。また、吸引ポンプの代わりに真空ラインを使用してもよい。

【0024】本発明の方法においては、このようにして疎水性フィルターへの染色された細菌の捕集と過剰色素の除去とを同時に行ない、疎水性フィルターの着色度から試料中の細菌数を測定する。このようにして過剰の色素が除去された試料中の細菌の着色度から、試料中の細菌数を測定する。この細菌数の測定は、(1)色の対照表を用いて目視により比較するのが一番簡便であるが、(2)光学密度(O. D.)測定による比色定量法により行なうこともできる。目視判定の場合には、細菌捕集用の疎水性フィルターの表側の面のみならず、裏側の面の着色度より、測定することもできる。これらの場合には、それぞれの側用の色対照表や、吸光度と細菌数の検量線を作成すればよい。

【0025】上記(1)の目視による細菌数の測定は、具体的には、細菌捕集用の疎水性フィルター上に存在する細菌の着色度、即ち色の強度を、既知量の細菌数の試料を用いて予め作成しておいた色の対照表と比較することにより行なえばよい。色の対照表は、細菌数が既知の試料を用い、本発明の方法で染色、洗浄した細菌捕集用の疎水性フィルターをカラー写真に撮ることにより、又は、この染色された細菌捕集用の疎水性フィルターと同程度に濾紙等を着色したり、或いは同程度の色を紙に印刷することにより、作成することができる。

【0026】例えば、尿中の細菌数を測定する場合には、次のようにして色の対照表を作成する。すなわち、尿中細菌は健常人の尿にも低濃度〔多い場合でも1ml(ミリリットル)当たり1万個程度〕存在するが、総数で1ml当たり10万個以上存在した場合には細菌尿症の疑いありと判断され、1ml当たり100万個以上の場合には細菌感染(細菌尿症)が確定的である。従って、通常、1万個/ml、10万個/ml、100万個/mlの3点の場合の標準色対照表を作成すればよいが、勿論、これに限定されるものではない。

【0027】このように色の対照表を用いる場合には、この色対照表に、前記した細菌捕集用の疎水性フィルター、該フィルターを装着しうる濾過具、色素液と洗浄液(或いは前もって色素を添加しておいた色素含有洗浄液)、必要に応じてさらに、細菌以外の動物細胞を除去するためのプレフィルターや、試料採取ピペットを組み合わせ、試料中の細菌数を迅速、かつ、簡便に測定しうる測定キットとすることができる。なお、加圧濾過に

使用する注射器は特に制限はない。吸引濾過具は、細菌捕集用の疎水性フィルターと組み合わせて吸引濾過できるものであればよく、特に制限はない。また、加圧濾過具や吸引濾過具の材質は、ガラス製とプラスチック製のいずれをも使用することができる。さらに、その容量は、使用する洗浄液等の液量に応じて選択すればよい。また、細菌捕集用の疎水性フィルターと、この吸引濾過具とを一体化することもできる。

【0028】また、上記(2)の光学密度(O. D.)測定による比色定量は、細菌捕集用の疎水性フィルター上に存在する細菌を着色した色素を、有機溶剤を用いて溶出させ、溶出液の着色度を吸光度により測定し、予め作成した光学密度(O. D.)と細菌数との検量線と照合して定量すればよい。吸光度測定時の波長は、用いる色素により、適宜定めればよい。ここで有機溶剤としては、各種アルコール類を使用することができるが、特にエタノールが好ましい。

【0029】なお、検量線の作成は、例えば次のようにして行なえばよい。即ち、色素としてフクシンを用いた場合には、各種の濃度に希釈した試料の着色度を、マイクロプレートリーダーを用いて、着色度を492nmの光学密度(O. D.)により測定しておき、一方、各種の濃度に希釈した試料と同一試料の試料溶液中の細菌数を、寒天平板培養法のコロニー数の計数により算出しておき、両者の結果から細菌数と光学密度の検量線を作成すればよい。

【0030】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

#### 30 実施例1

##### (1)細菌数測定用色の対照表の作成

種菌として、大腸菌(*Escherichia coli*)(ATCC 11303)及び黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)(IFO 3183)を用いて以下の試験を行なった。肉汁ブイヨン培地に種菌を接種して、37℃で24時間の静置培養を行ない、培養液を標準試料用菌懸濁液とした。一方、健常人男子の放出尿を採取して、濾過孔径が0.5μmのポリテトラフルオロエチレン製メンブレンフィルター(東洋濾紙製)で濾過して、細菌希釈用液を調製した。この標準試料用菌懸濁液に所定量の前記細菌希釈用液を添加して、各細菌数が

①1万個/ml程度、②10万個/ml程度、③100万個/ml程度の濃度となるように、3種の標準試料を調製した。なお、細菌数はCLED寒天平板培地で、37℃、24時間培養した際のコロニー数により計数した。

【0031】標準試料を尿採取スポイト〔妊娠診断薬「ゴナビスライド・新ゴナビスライド」(持田製薬製)の動物細胞除去用濾過管付ピペット〕で吸い取り、濾過管を取り除いた後、その3滴(130μl)を、濾過孔

径が0.5μmのポリテトラフルオロエチレン製メンブレンフィルター（口径3mm、東洋濾紙製）を先端付近に装着した3ml容の注射器内に添加し、次いでフクシン色素液〔日水製薬製のフクシン液（濃度0.02％）に3倍量の水を添加した液〕1滴（40～50μl）を添加し、続いて洗浄液〔0.05％(W/V) ツイーン20添加PBS緩衝液、pH7.0〕1mlを滴下して加圧濾過を行なった。加圧濾過後、前記疎水性フィルターを外し、この細菌捕集用の疎水性フィルター上に存在する細菌の着色度（直径3mmの円の着色度）を目視により観

察した結果、下記の第1表の通りであった。なお、洗浄液に前もって色素液を添加した色素液含有洗浄液を使用した場合にも、同様の結果を得た。また、菌無添加では着色しなかった。色素液は使用に際し、上記と同様の0.5μmのポリテトラフルオロエチレン（PTFE）製フィルター（東洋濾紙製）で濾過して、微粒子を除去した。測定時間は30秒であった。  
【0032】  
【表1】

第1表

標準試料	着色の程度と判定			
	大腸菌	判定 (個/ml)	黄色ブドウ 球菌	判定 (個/ml)
①	極めて弱いか 又はなし	≤10 <sup>4</sup> 1万以下	極めて弱いか 又はなし	≤10 <sup>4</sup> 1万以下
②	弱い（薄いピ ンク色）	10 <sup>5</sup> 10万程度	弱い（薄いピ ンク色）	10 <sup>5</sup> 10万程度
③	強い（赤色）	≥10 <sup>6</sup> 100万以上	強い（赤色）	≥10 <sup>6</sup> 100万以上
菌無添加	着色なし	—	着色なし	—

【0033】これらの着色したフィルターを、標準サンプルとしてカラー写真にとり、色の対照表とした。なお、大腸菌と黄色ブドウ球菌との間で着色の程度に大差はなかった。

【0034】（2）尿中細菌数の測定

健常人の放出尿及び各種患者の放出尿を、尿採取スポイト〔妊娠診断薬「ゴナビスライド・新ゴナビスライド」（持田製薬製）の濾過管付ピペット〕で吸い取り、濾過管を取り除いた後、その3滴（130μl）を、濾過孔径が0.5μmのポリテトラフルオロエチレン製メンブレンフィルター（口径3mm、東洋濾紙製）を先端付近に装着した3ml容の注射器内に添加し、次いでフクシン色素液〔日水製薬製のフクシン液（濃度0.02％）に3倍量の水を添加した液〕1滴（40～50μl）を添加し、続いて洗浄液〔0.05％(W/V) ツイーン20添加PBS緩衝液、pH7.0〕1mlを滴下して加圧濾

過を行なった。加圧濾過後、前記疎水性フィルターを外し、この細菌捕集用の疎水性フィルター上に存在する細菌の着色度（直径3mmの円の着色度）を目視により観察し、上記（1）で作成した色の対照表と比較して目視による判定を行なった。結果を第2表に示す。なお、洗浄液に前もって色素液を添加した色素液含有洗浄液を使用した場合にも、同様の結果を得た。また、菌無添加では着色しなかった。色素液は使用に際し、上記と同様の0.5μmのポリテトラフルオロエチレン（PTFE）製フィルター（東洋濾紙製）で濾過して、微粒子を除去した。なお、比較のために、CLED寒天平板培地（37℃で24時間培養）で測定した細菌数も併せて表示した。測定時間は30秒であった。

【0035】  
【表2】

第2表

尿試料採取先	本発明法による 判定 (個/ml)	CLED寒天平板法 による細菌数 (個/ml)
健常人A (男性55才)	$\leq 10^4$	$2.3 \times 10^8$
健常人B (女性50才)	$\leq 10^4$	$1.0 \times 10^4$
患者A (糖尿病、年齢不明)	$\geq 10^6$	$1.3 \times 10^6$
患者B (糖尿病、年齢不明)	$10^5$	$8.5 \times 10^4$
患者C (尿路感染症、年齢不明)	$\geq 10^6$	$1.0 \times 10^7$
患者D (肝炎、年齢不明)	$\geq 10^6$	$8.2 \times 10^6$
患者E (尿路結石、年齢不明)	$\leq 10^4$	$1.5 \times 10^8$

## 【0036】比較例1

特開平4-218392号に記載された方法に従って、尿中の細菌数を測定したところ、測定時間は3分であった。

## 【0037】

【発明の効果】本発明の方法によれば、1段階の濾過操作で疎水性フィルターへの染色された細菌の捕集と過剰色素の除去を同時に行なうことができ、試料中の細菌数を迅速、かつ、簡便に測定することができる。本発明の方法によれば、通常、1分以内に判定可能である。しかも本発明の方法によれば、専門的な技術や知識を必要とせずに、試料中の細菌数を測定することができる。しかも本発明の方法によれば、細菌の培養なしに、細菌の有無が分かるので、病院の細菌検査の検体スクリーニングに活用することができ、患者及び病院の経費軽減に貢献することができる。また、本発明の方法においては、特

別な機器を必要としないので、小規模な病院や診療所、或いは一般の人でも測定することができる。さらに、本発明の方法は、疎水性フィルターの濾過孔径を選択することにより、多くの細菌に適用できるので、応用範囲も極めて広い。また、測定キットとした場合には、極めて簡単、かつ、安価なものであって、特別な機器を必要としないので、どのような現場においても使用することができるという利点がある。特に、一般の素人も使用することができるため、簡単に河川水、池水、海水、温泉水などの身の回りの水質の検査が可能となり、環境保全に貢献することができるばかりか、液状食品や固形食品などの食品における細菌数の検査等が可能となるという特質がある。従って、本発明は、尿検査分野（診断領域）や金属加工分野をはじめ、各種検査に広く利用することができる。